

Diferencijacija mišićnih stanica C2C12 u prisustvu hidrolizata proteina lana

Šest, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:737087>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Anamarija Šest
0058222528

**DIFERENCIJACIJA MIŠIĆNIH STANICA C2C12 U PRISUSTVU HIDROLIZATA
PROTEINA LANA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2024 godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diferencijacija mišićnih stanica C2C12 u prisustvu hidrolizata proteina lana

Anamarija Šest, 0058222528

Sažetak:

Biljni hidrolizati proteina bogati su izvor peptida i ostalih bioaktivnih spojeva zbog čega se u znanstvenim istraživanjima ispituje njihovo djelovanje na održavanje i rast stanica u kulturi. U ovom eksperimentu ispitano je djelovanje hidrolizata proteina lana na vijabilnost i diferencijaciju mišićnih stanica C2C12. Isto tako ispitano je i posjeduje li hidrolizat proteina lana protektivni učinak na atrofiju C2C12 stanica izazvanu tretmanom deksametazonom. Stanice C2C12 tretirane su hidrolizatom proteina lana u rasponu koncentracija 0,5 – 5 mg/mL i određena je vijabilnost stanica nakon 48 h. U cilju određivanja protektivnog učinka hidrolizata proteina lana, stanice su tretirane s 1 mg/mL hidrolizata te je kroz sedam dana praćen njegov utjecaj na diferencijaciju mišićnih stanica. Protektivni učinak 1 mg/mL hidrolizata na atrofiju C2C12 stanica izazvanu tretmanom 100 μ M deksametazona praćen je tijekom dva dana. Metodom bojanja tripan plavo određen je broj stanica, vijabilnost stanica određena je MTS metodom, a učinak na diferencijaciju određen je mjerenjem promjera stanica programom Digycyte i bojanjem stanica bojom kristal – ljubičasto. Na temelju dobivenih rezultata, vidljiv je inhibirajući učinak hidrolizata lana na vijabilnost stanica C2C12 u rasponu od 7,89-17,37 %. Rezultati su pokazali i smanjenje promjera diferenciranih miotuba tretiranih hidrolizatom za 10 %. Usporedbom morfologije kontrolnih i tretiranih stanica s 1 mg/mL hidrolizata lana, uočeno je kako tretirane stanice pokrivaju manju površinu za rast i prisutne su u obliku okruglih nakupina u odnosu na netretirane stanice. Također, uočen je i blagi protektivni učinak hidrolizata lana (+6,5 %) na atrofiju C2C12 stanica u usporedbi sa stanicama tretiranim samo sa 100 μ M deksametazona.

Ključne riječi: atrofija, C2C12 stanice, diferencijacija, hidrolizat proteina lana, vijabilnost

Rad sadrži: 25 stranica, 10 slika, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Datum obrane: 10. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Differentiation of muscle cells C2C12 in presence of flaxseed protein hydrolysate

Anamarija Šest, 0058222528

Abstract:

Plant protein hydrolysate are a rich source of peptides and other bioactive substances which is the reason why scientific research examines their effect on the maintenance and growth of cultured cells. This experiment examines the effect of flaxseed protein hydrolysate on the viability and differentiation of muscle cell C2C12. It was also tested whether the hydrolysate has protective effect on C2C12 atrophy induced by dexamethasone treatment. C2C12 cells were treated with flaxseed protein hydrolysate in concentration range of 0,5 – 5 mg/mL and viability was determined after 48 h. In order to determinate protective effect of flaxseed protein hydrolysate, the cells were treated with 1 mg/mL hydrolysate and its effect on differentiation of muscle cells was monitored over seven days. Protective effect of 1 mg/mL hydrolysate on C2C12 cell atrophy induced by dexamethasone treatment was monitored for two days. The number of cells was determined by Trypan blue method, viability of cells was determined by MTS method, and the effect on differentiation was determined by measuring diameter with program Digicyte and by staining cells with crystal - violet. Based on the obtained results, the inhibiting effect of flaxseed protein hydrolysate on viability of cells is visible in range of 7,89 - 17,37 %. The results also showed a 10 % reduction in the diameter of differentiated myotubes treated with the hydrolysate. By observing the morphology of untreated and treated cells with 1 mg/ml hydrolysate, it was noticed that treated cells cover a smaller area for growth and form a round clusters in relation to untreated cells. In addition, a mild protective effect of flaxseed hydrolysate was observed (+6,5 %) on C2C12 cells atrophy compared to cells treated only with 100 μ M dexamethasone.

Keywords: atrophy, C2C12 cells, differentiation, flaxseed protein hydrolysate, viability

Thesis contains: 25 pages, 10 figures, 32 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Višnja Gaurina Srček, PhD, Full Professor

Thesis defended: July 10th, 2024

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	Kultura stanica	2
2.2.	Biljni hidrolizati kao dodatak mediju za uzgoj životinjskih stanica	4
2.3.	Diferencijacija mišićnih stanica	6
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1.	Materijali	9
3.1.1.	Hidrolizat uljne pogače lana	9
3.1.2.	Kemikalije	9
3.1.3.	Otopine i puferi	9
3.1.4.	Uređaji i oprema	10
3.2.	Metode	10
3.2.1.	Uzgoj C2C12 stanične linije	10
3.2.2.	Određivanje broja stanica C2C12 stanica metodom tripan plavo	11
3.2.3.	Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na vijabilnost C2C12 stanica MTS metodom	12
3.2.4.	Učinak hidrolizata proteina lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica	13
3.2.5.	Bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto	14
3.2.6.	Obrada podataka	14
4.	REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1.	Učinak hidrolizata lana na vijabilnost C2C12 stanica	15
4.2.	Učinak hidrolizata lana na diferencijaciju C2C12 stanica	17
4.3.	Učinak hidrolizata lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica	19
5.	ZAKLJUČCI	21
6.	POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Pojam kulture stanica odnosi se na sve stanice izuzete iz životinjskih i biljnih tkiva i organa koje su potom uzgajane u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Danas, razvojem različitih tehnika uzgoja i boljim poznavanjem biologije kultiviranih stanica, kultura stanica pronalazi svoju primjenu u proizvodnji biofarmaceutika, razvoju i primjeni genske terapije, tkivnom inženjerstvu i istraživanjima matičnih i tumorskih stanica.

Jedna od staničnih linija koja je pronašla svoju primjenu u istraživanjima je i besmrtna stanična linija mišjih skeletnih mioblasta C2C12. Ona se danas primjenjuje kao stanični model skeletnog mišićnoga tkiva u istraživanjima rasta i diferencijacije mišićnih stanica. Uzgojem stanica *in vitro* moguće je potaknuti mioblaste na diferencijaciju u miotube i istražiti pokazuju li određene tvari pozitivan učinak na vijabilnost i diferencijaciju stanica.

Biljni proteinski hidrolizati su proizvodi nastali enzimskom, kemijskom i mikrobnom razgradnjom proteina iz različitih biljnih sirovina. Oni sadrže biološki aktivne peptide i hranjive tvari kao što su aminokiseline, vitamini, minerali, ugljikohidrati i lipidi koji imaju brojne pozitivne učinke i na održavanje i rast staničnih kultura *in vitro*. S obzirom da posjeduju blagotvorna svojstva, istražuje se njihova primjena kao alternativa za proteine iz životinjskog seruma koji se dodaju u medije za uzgoj stanica.

Brojna znanstvena istraživanja pokazala su da proteini izolirani iz sjemenki lana mogu poslužiti kao izvor bioaktivnih peptida s brojnim pozitivnim učincima na zdravlje ljudi koji uključuju antimikrobno, antihipertenzijsko, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Isto tako, poznato je da neki hidrolizati proteina izolirani iz sirovina poput sirutke i soje, uz ostala funkcionalna svojstva, pokazuju pozitivne učinke i na stimulaciju sinteze proteina mišića. Budući da su proteini esencijalni nutrijenti za rast mišićne mase, u našem radu željeli smo istražiti kako hidrolizat proteina lana djeluje na diferencijaciju mišićnih C2C12 stanica te posjeduje li protektivni učinak na atrofiju stanica izazvanu djelovanjem deksametazona.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura stanica

Kultura stanica je opći pojam koji obuhvaća sve stanice koje su izdvojene iz životinjskih i biljnih tkiva i organa te su zatim uzgojene u laboratorijskim uvjetima. Prvi počeci kulture stanice pripisuju se Rossu G. Harrisonu koji je 1907. god. metodom viseće kapi uspješno održao normalne funkcije živčanih stanica izvan organizma iz kojeg su potekle, odnosno embrija žabe. Ovaj eksperiment otvorio je mogućnost upotrebe kultura stanica za različita istraživanja u histologiji, embriologiji i fiziologiji, ali i mogućnost njihove upotrebe u proizvodnji cjepiva, lijekova i monoklonskih antitijela. Zbog njihovog velikog potencijala sredinom 20. stoljeća, razvit će se aseptične tehnike uzgoja i metoda tripsinizacije koje će imati značajnu ulogu na upotrebu kultura stanica (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

S obzirom da se u ovom radu primjenjuju mišji skeletni mioblasti C2C12, primarno će se u ostatku poglavlja govoriti o kulturama životinjskih stanica. Primarnom kulturom nazivamo kulturu životinjskih stanica pripremljenu direktno iz tkiva ili organa izuzetih neposredno iz organizma (Radošević, 2020). Takve stanice su fenotipski heterogene, karakterizira ih mala brzina rasta i zadržavaju funkciju tkiva iz kojeg su potekle što ih čini prikladnima za *in vitro* istraživanja. Ipak, teško ih je održati u laboratorijskim uvjetima i imaju ograničeni životni vijek. One će preživjeti *in vitro* sve dok ne potroše sav prostor za rast i sve hranjive tvari prisutne u mediju za uzgoj. Prema načinu uzgoja razlikujemo dvije vrste primarnih staničnih kultura, adherentne stanice koje rastu prihvaćene za podlogu i rast im je ograničen kontaktnom površinom i suspenzijske stanice koje rastu neovisno o površini. Na temelju morfologije stanica možemo ih podijeliti na tri tipa: epitelne stanice, fibroblasti i limfoblasti. Epitelne su spljoštene adherentne stanice poligonalnog oblika. Fibroblasti kao i epitelne stanice rastu pričvršćeni za podlogu, ali su izduženog oblika. Limfoblasti su za razliku od ostalih tipova suspenzijske stanice i sfernog su oblika. Kada se primarna kultura subkultivira, odnosno precijepi u svježiji medij i uzgaja kroz duže vrijeme, dobivaju se jednolične stanice zvane sekundarna stanična kultura. Precijepivanjem stanica iz primarne kulture dobivaju se stanične linije koje, ovisno o životnom vijeku, mogu biti konačne i kontinuirane. Konačne stanične linije karakterizira ograničeni broj dioba prije nego stanice izgube mogućnost proliferacije i ulaze u fazu senescencije. Kod normalnih stanica svakom novom diobom stanice postepeno dolazi do skraćivanja telomernih krajeva kromosoma sve dok oni ne dosegnu nedostatnu duljinu za daljnju replikaciju DNA čime nastupa faza senescencije i konačnog odumiranja stanica. Provođenjem postupka imortalizacije se sprječava senescencija i uspostavlja kontinuirana ili besmrtna stanična linija koju je moguće kultivirati beskonačni broj puta. Imortalizacija se

najčešće provodi transfekcijom životinjskih stanica virusnim genima i induciranom ekspresijom gena zaslužnih za sintezu telomeraze (Freshney, 2011). Besmrtno stanične linije dobivene takvim postupkom rasti će brže, postizati veću gustoću stanica u mediju, moći će se uzgajati u mediju bez seruma i proteina te će se potencijalno upotrebljavati kao suspenzijske stanice u industrijskoj proizvodnji. Njihovi veliki nedostaci su genetička nestabilnost, različitost fenotipa od roditeljskih stanica i gubitak mogućnosti diferencijacije kod nekih staničnih linija (Verma i sur., 2020; Freshney, 2011). Za biotehnološke svrhe najznačajnija je stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-K1 koja je kao i ostale stanične linije komercijalno dostupna u bankama stanica kao što su ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) i ATCC (American Type Culture Collection) (Radošević, 2020).

Provođenjem uzgoja stanica *in vitro* potrebno je poštivanje aseptičnih uvjeta rada kako bi se spriječila kontaminacija kultura. U laboratoriju bi trebao biti osiguran odvojeni prostor za rad s kulturama stanicama i prostor za sterilizaciju, pranje i pripremu reagensa i pribora. U prostoru za rad s kulturama ne smije biti kretanja velikog broja ljudi i prašine zbog čega prostor treba biti dobro prozračen. Potrebno je da u tom prostoru bude lako dostupna osnovna oprema za rad koju čine komora za sterilan rad (laminar), inkubator s atmosferom CO₂, autoklav i svjetlosni mikroskop, a kako bi se kulture stanica nesmetano mogle održavati i rasti.

Kako bi stanice mogle rasti i umnožavati se u umjetnom okruženju potrebno im je osigurati fizikalno – kemijske uvjete i nutrijente što sličnije onima u organizmu iz kojih su izdvojene. Stanice se uzgajaju u kemijski definiranom mediju čija je uloga osigurati sve hranjive tvari, održati pH i osmolarnost stanice. U uzgoju je bitno odabrati kvalitetan medij koji će sadržavati ugljikohidrate (glukoza), aminokiseline, vitamine, minerale, anorganske soli i serum. Stanica će kao izvor energije za rast i izvor ugljikovih atoma koristiti glukozu iz medija, dok će esencijalne aminokiseline koristiti kao izvor dušika. Potreba za određenim aminokiselina ovisit će o mogućnosti stanice da ih samostalno sintetizira. Vitamini topljivi u vodi kao što su vitamini B skupine (folna kiselina, nikotiamid, pantotenska kiselina) nalazit će se u mediju za uzgoj i stanici će biti potrebni u malim količinama. Oni će imati bitnu ulogu u metaboličkim reakcijama gdje služe kao kofaktori i prostetske skupine. Za poticanje proliferacije i diferencijacije stanica koristit će se hormoni i faktori rasta prisutni u serumu. Zajedno s njima u serumu mogu biti prisutni lipidi, proteini, vitamini topljivi u mastima i minerali. Za uzgoj stanica *in vitro* primjenjuje se komercijalni hranjivi medij čiji je sastav kemijski definiran kao što su Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) i RPMI 1640 koji su prikladni su za uzgoj većine staničnih linija, a kompletni medij se dobiva dodatkom seruma kao što su goveđi, ljudski i konjski kojima je moguće prilagoditi svojstva za uzgoj specifičnih stanica.

Danas najveću primjenu stanične kulture imaju u proizvodnji biofarmaceutika kao što su

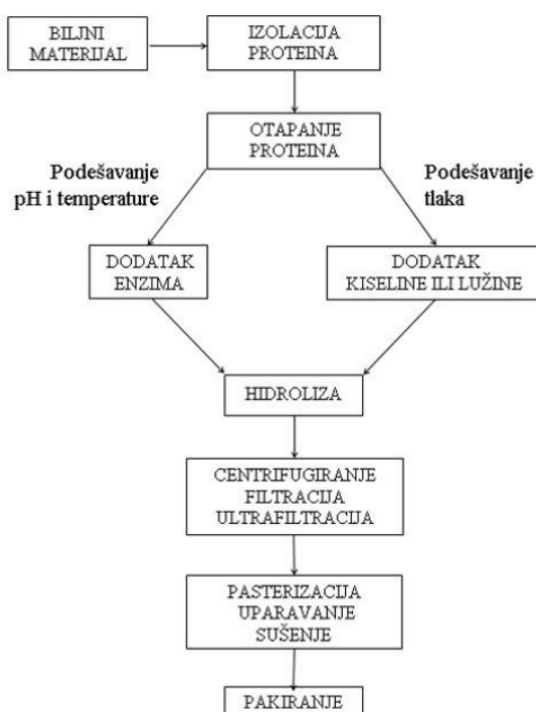
cjepiva, monoklonska antitijela i rekombinantni proteini. Prema literaturnim podacima, 67% odobrenih biofarmaceutika proizvedeno je tehnologijom koja koristi stanice sisavaca od čega 53,5% otpada na monoklonska antitijela (Walsh i Walsh, 2022). Kulture stanica koriste se i u raznim istraživanjima matičnih i tumorskih stanica, za testiranje i razvoj novih lijekova, u genskoj terapiji i tkivnom inženjerstvu.

2.2. Biljni hidrolizati kao dodatak mediju za uzgoj životinjskih stanica

U komercijalne medije za uzgoj stanica dodaju se različite vrste seruma najčešće životinjskog podrijetla, bogatih bioaktivnim komponentama kao što su faktori rasta, hormoni, lipidi, vitamini, proteini i minerali koje omogućuju održavanje i proliferaciju stanica u kulturi (O'Flaherty i sur., 2020). Međutim, postoje i određeni problemi korištenja životinjskih seruma, a najveći su varijabilnost sastava seruma od šarže do šarže, mogućnost kontaminacije kulture mikroorganizmima prisutnim u serumu i visoka cijena upotrebe seruma u proizvodnji biofarmaceutika (O'Flaherty i sur., 2020). Zbog navedenih problema razvijaju se mediji bez seruma koji bi bili jeftiniji, jednostavniji za proizvodnju i imali veću stopu reproducibilnosti nego serumi (Ho i sur., 2021). Kao jedna od mogućih alternativa promatra se i primjena hidrolizata proteina. Oni nastaju enzimskom, kemijskom i mikrobiološkom hidrolizom proteina dobivenih iz životinjskih tkiva (npr. goveda, svinje, kokoši) i biljaka (npr. soja, riža, lan, krumpir), a uz peptide sadrže ostale hranjive tvari kao što su aminokiseline, anorganske kiseline, minerali, vitamini, ugljikohidrati i lipidi. S obzirom kako se upotrebom hidrolizata životinjskih proteina nameću isti problemi kao i upotrebom animalnih seruma, primarno se istražuje upotreba hidrolizata biljnog porijekla.

Hidrolizate proteina moguće je pripremiti kemijskom, enzimskom i mikrobnom razgradnjom, a u biotehnološkoj industriji primarno se koriste hidrolizati pripremljeni enzimskom hidrolizom. Kemijska hidroliza dijeli se na alkalnu i kiselinsku hidrolizu. Za kiselinsku hidrolizu najčešće se koristi klorovodična i sumporna kiselina. Pri proizvodnji hidrolizata potrebno je osigurati ključne parametre koji uključuju koncentraciju korištene kiseline, temperaturu (121°C – 138 °C), tlak (32 – 42 psi) i trajanje hidrolize (2 – 8 h) jer će svaki od parametra zasebno ili u kombinaciji utjecati na kvalitetu proizvedenog hidrolizata (Pasupuleti i Braun, 2010). Zbog visoke temperature i tlakova primijenjenih tijekom proizvodnje, hidroliza se odvija u čeličnim bioreaktorima. Alkalna hidroliza vrlo je jednostavan i jeftin postupak. Proteini se zagrijavaju sve dok ne dođe do njihove solubilizacije nakon čega se dodaju kalcijev, natrijev i kalijev hidroksid i temperatura se zadržava u rasponu 27 °C – 54 °C. Postupak će trajati nekoliko sati

dok se ne zadovolji potreban stupanj hidrolize (Pasupuleti i Braun, 2010). Ova vrsta hidrolize nema primjenu u biotehnološkoj industriji. Glavni nedostaci kiselinske i alkalne hidrolize su uništenje esencijalnih aminokiselina koje se nalaze u hidrolizatima zbog čega se daje prednost upotrebi enzimske hidrolize u biotehnološkoj proizvodnji. Enzimi koji se koriste za enzimsku hidrolizu u biotehnologiji su životinjskog, biljnog i mikrobnog podrijetla, a najčešće korišteni enzimi za pripremu hidrolizata proteina su tripsin, pankreatin i pepsin, papain i bromelain iz biljnih izvora te bakterijske i fungalne proteaze (Pasupuleti i Braun, 2010). Enzimska hidroliza preferirana je metoda u odnosu na kemijske metode jer u konačnom produktu ne zaostaju toksični nusprodukti i sam proces se provodi pri blažim uvjetima (pH 6 – 8, temperatura 40 °C – 60 °C) (Nasri, 2017). Kod provođenja hidrolize najprije je potrebno usitniti supstrat, a zatim podesiti vrijednosti pH i temperature za specifično djelovanje enzima koji će se dodati (Gaurina Srček i sur., 2022). Kako bismo dobili proteinski hidrolizat željenih svojstva potrebno je koristiti dobar enzim, kontrolirati reakciju i parametre kao što su pH, temperatura, brzina miješanja i vrijeme trajanja reakcije (Gaurina Srček i sur., 2022).



Slika 1. Uobičajeni postupak pripreve proteinskih hidrolizata (Gaurina Srček i sur., 2022)

Općenito će na sastav hidrolizata proteina utjecati primijenjeni postupak hidrolize, ishodna sirovina, temperatura i trajanje postupka (Gaurina Srček i sur., 2022). Ujedno je potrebno pripaziti na raspon molekulskih masa peptida jer će on utjecati na primjenu hidrolizata u specifične svrhe. Na primjer, hidrolizati peptida malih molekulskih masa kao što su lan i riža,

posjeduju jače antioksidativno djelovanje od peptida većih od 3 kDa, a hidrolizati čiji sastav većinski čine peptidi manji od 10 000 Da ne smatraju se proteinskim alternativama (Ho i sur., 2021). Završetkom hidrolize potrebno je upotrijebiti različite metode izolacije i pročišćavanja proteina kako bi se dobile frakcije hidrolizata i obogatile biološki aktivnim peptidima. Primjenjuju se različite kromatografske metode (gel kromatografija, kromatografija na ionskom izmjenjivaču, tekućinska kromatografija, HPLC) i metode filtracije kao što je ultrafiltracija. Na odabir metoda utjecat će fizikalna i kemijska svojstva peptida kao što su naboj, veličina i hidrofobnost.

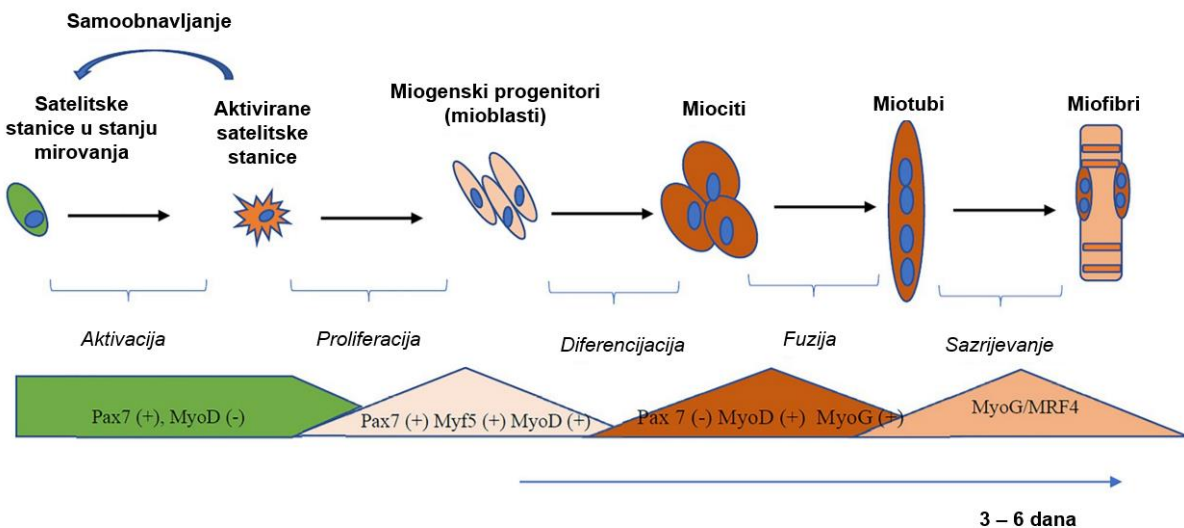
Primijećeno je da peptidi koji se nalaze u hidrolizatu posjeduju biološke aktivnosti kao što su antioksidativna svojstva, antimikrobno, antitumorno i imunomodulacijsko djelovanje koje će blagotvorno utjecati na održavanje i rast stanica (Gaurina Srček i sur., 2022). Antioksidansi su sve molekule koje mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju bioloških molekula uklanjanjem ili inhibicijom slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih atoma. Hidrolizati proteina će posjedovati antioksidacijska svojstva ako sadržavaju povećani udio histidina, prolina, cisteina, metionina i aromatskih aminokiselina. Na primjer, hidrolizat proteina tamnocrvenog graha pokazuje jača antioksidacijska svojstva u odnosu na nehidrolizirane proteine (Roy i sur., 2020). Imunomodulacijsko djelovanje hidrolizata vidljivo je kao povećanje fagocitoze, povećanje razine citokina, utjecaj na proliferaciju stanica i povećanu aktivnost NK stanica (eng. *Natural kill*) (Kiewiet i sur., 2018). Antimikrobna svojstva pokazuju hidrolizati obogaćeni peptidima pozitivnog naboja što su potvrdili Song i suradnici (2020) istražujući antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost hidrolizata pamuka.

2.3. Diferencijacija mišićnih stanica

Mišićni sustav glavni je sustav za kretanje kralježnjaka i većine beskrležnjaka. Mišići svojim kontrakcijama omogućuju gibanje unutarnjih organa, kostiju i zglobova te zadržavanje tjelesne topline u hladnim uvjetima. Sva mišićna tkiva i organi u tijelu kralježnjaka građeni su od najmanje strukturne jedinice, mišićne stanice zvane miocit. Prema razlikama u građi i funkciji miocita razlikujemo tri skupine mišića, glatke, srčane i skeletne mišiće. Tkivo glatkih mišića izgrađeno je od snopova vretenastih miocita u čijoj je sredini vidljiva jezgra. Kontrakcije miocita pod kontrolom su autonomnog živčanog sustava te su ritmične, sporije i slabijeg intenziteta nego kod skeletnog i srčanog mišićnog tkiva. Glatko mišićje izgrađuje stijenke krvnih žila, šuplje unutarnje organe (želudac, mokraćni mjehur, maternicu) i nalazi se u šarenici oka. Skeletno mišićno tkivo čini glavninu mišićne mase kralježnjaka, a kontrakcija mišića je pod

kontrolom vlastite volje. Za razliku od glatkih mišića, u skeletnom mišićnom tkivu nisu vidljive pojedinačne stanice jer tijekom embrionalnog razvoja dolazi do fuzije velikog broja miocita u višejezrena mišićna vlakana miofibre. Tkivo je građeno od više snopova miofibra koje će na okupu držati vezivno tkivo zvano epimizij. Svaki snop miofibra građen je od većeg broja mišićnih vlakanca miofibrila koji se nalaze u sarkolemi (citoplazma), a okruženi su staničnom membranom miofibra zvanom sarkoplazma. Miofibrili su sastavljeni od velikog broja tanjih (aktina) i debljih (miozina) mikrofilamenata koji se protežu uzduž osi mišićnog vlakna. Raspored mikrofilamenata aktina i miozina pod svjetlosnim mikroskopom zaslužan je za optičku pojavu poprečne ispruganosti zbog čega se mišići ujedno i zovu poprečno prugasti mišići. Srčano mišićno tkivo izgrađuje samo jedan organ odnosno srce. Tkivo je građom slično skeletnom i također je poprečno isprugano, ali ipak postoje bitne razlike u građi. Srčana mišićna vlakna su razgranjena i umrežena što omogućuje koordiniran rad srca, odnosno prenošenje impulsa s vlakna na vlakno i lakše podnošenje trajnih i snažnih kontrakcija koje nisu pod utjecaja vlastite volje.

U ovom radu korištena je besmrtna stanična linija skeletnih mišićnih mioblasta C2C12 pa će u ostatku poglavlja primarno biti objašnjena diferencijacija mišićnih stanica skeletnog tkiva. Miogeneza je kompleksan proces koji dovodi do formiranja skeletnog mišićnog tkiva tijekom embrionalnog razvoja i regeneracije tkiva nakon njegova oštećenja. Proces uključuje proliferaciju pluripotentnih stanica i njihovu konverziju u mioblaste, izlazak mioblasta iz staničnog ciklusa i diferencijaciju do mišićnih vlakna. Proces miogeneze reguliran je transkripcijskim faktorima zvanim miogenetski regulacijski faktori (MRFs, eng. *myogenic regulatory factors*) čijoj grupi pripadaju myoD (eng. *myogenic differentiation*), myf5 (eng. *myogenic factor 5*), miogenin (MyoG) i MRF4 (eng. *myogenic regulatory factor 4*). MRFs sadrže domenu bHLP (eng. *basic helix – loop – helix*) koja će se heterodimerizirati s članovima obitelji proteina E i u obliku kompleksa vezati na određenu sekvenciju DNA zvanu E – box na pojačivačima i promotorima gena specifičnih za mišićne proteine i tako ih aktivirati (Hernández-Hernández i sur., 2017; Bajek i sur., 2015). Transkripcijski faktori myf5 i myoD su determinacijski faktori koji usmjeravaju razvoj stanica u mišićne stanice dok je uloga regulacijskih faktora miogenin i MRF4 poticanje mioblasta na diferencijaciju i fuziju u mišićna vlakna. Na slici 2. prikazani su koraci regenerativne miogeneze kojom dolazi do obnavljanja starog i oštećenog mišićnog tkiva.



Slika 2. Aktivacija satelitskih stanica i diferencijacija mioblasta (Isesele i Mazurka, 2021)

Regenerativna miogeneza započinje ozljedom mišićnog tkiva i ekspresijom myoD koji potiče aktivaciju mitotički pasivnih satelitskih stanica smještenih između sarkoleme i bazalne membrane mišićnih vlakna miofibra (Holterman i Rudnicki, 2006). Uz myoD u svakoj aktiviranoj stanici dolazi do ekspresije regulacijskog čimbenika myf5 i homeobox transkripcijskog faktora Pax7 (eng. *paired box 7*) koji će omogućiti ulazak aktivirane stanice u stanični ciklus i proliferaciju stanica do mononuklearnih mioblasta. MyoD regulacijski čimbenik će ujedno i potaknuti ekspresiju miogenina (MyoG) i time smanjiti ekspresiju myf5 i Pax7 što će uzrokovati izlazak mioblasta iz staničnoga ciklusa. Diferencijacija mioblasta u izdužene miocite inicirat će se zajedničkim djelovanjem myoD i miogenin te će potaknuti ekspresiju MRF4 (eng. *myogenic regulatory factor 4*). Miociti će se zatim fuzionirati u višejezgrene miotube u kojima dolazi do ekspresije specifičnih mišićnih proteina kao što su miozinski teški lanca (eng. *myosin heavy chain*), miozinski laki lanca (eng. *myosin light chain*) i α – aktina (Char i Pourquie, 2017). Miotubi će moći fuzionirati s ostatkom miocita ili ostalim miotubima i sazrijeti u mišićno vlakno. Osim transkripcijskih i regulatornih faktora, na proces regenerativne miogeneze utjecat će i faktori rasta koji potječu iz oštećenih mišićnih vlakana. U aktivaciju mišićnih stanica uključen je hepatocitni faktor rasta (HGF, eng. *hepatocyte growth factor*), a proliferaciju i diferencijaciju pospješuju fibroblasti faktor rasta (FGF, eng. *fibroblast growth factor*) i inzulinu sličan faktor rasta (IGF, eng. *insulin growth factor*) (Bajek i sur. 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Hidrolizat uljne pogače lana

Hidrolizat uljne pogače konoplje pripremljen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije enzimskom hidrolizom proteina lana, izoliranih iz brašna uljne pogače lana prema protokolu opisanom u doktorskom radu M. Logarušića (2023). Početna koncentracija proteina u hidrolizatu iznosila je 70 g/L.

3.1.2. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), Gibco BRL, SAD
- HS (*Horse Serum*), Capricorn Scientific, Njemačka
- MTS reagens (*The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent*), Promega, Madison, SAD
- Deksametazon, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalij dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,4318 g
Kalij dihidrogenfosfat	0,2372 g
Destilirana voda	Do 1000 mL

Otopina deksametazona (10 mM)

Deksametazon	11,78 mg
Destilirana voda	3 mL

Otopina kristal ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto	0,2 g
2% etanol	10 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak DirectFREEZE -86 °C, ULTRA LOW, Nuve, Turska
- Komora za sterilan rad (stolni laminar), LFV 12, Iskra PIO, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, tip I CO₂-185, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Svjetlosni mikroskop, Axiostar, Zeiss, Njemačka
- Laboratorijski pribor (menzura, pipete, nastavci za pipete, epruvete, odmjerne tikvice, ploče za uzgoj stanica)
- Neubauer - ova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka

3.2. Metode

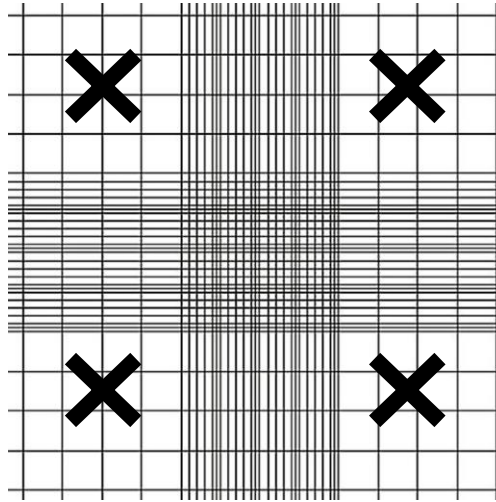
3.2.1. Uzgoj C2C12 stanične linije

U ovom radu korištena je stanična linija C2C12 koja je nabavljena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica. C2C12 je besmrtna stanična linija mišjih skeletnih mioblata koja brzo diferencira stvarajući kontraktilne miotube uz nastajanje karakterističnih proteina mišića. Osnovni medij za uzgoj sastoji se od DMEM kojem se dodaje 10 % fetalnog goveđeg seruma kako bi se dobio kompletni medij. Diferencijacija stanica započinje kada stanice dosegnu konfluentnost od oko 80 % nakon čega se medij za uzgoj zamjenjuje diferencijacijskim medijem (DM) koji sadrži DMEM uz dodatak 2 % konjskog seruma (HS).

3.2.2. Određivanje broja stanica C2C12 stanica metodom tripan plavo

Metoda bojanja stanica tripan plavo jedna je od najčešćih metoda za određivanje vijabilnosti stanica. Bojanje stanica tripan plavo omogućuje razlikovanje živih stanica od neživih zbog ulaska boje kroz oštećenu membranu nežive stanice (Louis i Siegel, 2011) Kako bi stanice mogli obojati i odrediti njihov broj potrebno je prvo odvojiti adherentne stanice od podloge Petrijeve zdjelice. Tripsinizacija je postupak cijepanja proteina koji povezuju stanice s podlogom i dobivanja suspenzije zaokruženih stanica. U postupku se najprije uklanja medij iz Petrijeve zdjelice, a zatim se adherentne stanice dva puta ispiru PBS puferom. Nakon ispiranja dodaje se 2 mL otopine tripsina. Tripsin je proteolitički enzim koji cijepa proteine na C terminalnom kraju aminokiselina arginina i lizina (Olsen i sur., 2004). Kako bi se djelovanje tripsina ubrzalo, stanice se stavljaju na 2 – 3 minute u inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ na temperaturu od 36,5 °C i 5 % CO₂. Potrebno je pripaziti na vrijeme inkubacije kako tripsin ne bi počeo razgrađivati stanice. Nakon proteklog vremena u Petrijevu zdjelicu dodaje se 8 mL medija sa serumom koji ujedno sadrži i tripsin inhibitor suprotnog djelovanja od tripsina. Stanice je potrebno resuspendirati u mediju. Uzorak za bojanje pripremljen je miješanjem 20 µL suspenzije stanica i 20 µL boje tripan plavo nakon čega je resuspendiran pomoću uzastopnih povlačenja u pipetu. Za brojanje stanica korištena je Neubauerova komorica. Komorica se sastoji od gornjeg i donjeg područja za brojanje koja se mogu zasebno napuniti, a za brojanje stanica se koriste četiri velika kvadrata u uglovima komorice koji su na Slici 3. označeni crnim križićem. Kvadrati su veličine 1 mm x 1 mm odnosno volumena $1 \cdot 10^{-4}$ mL, a sastoje se od šesnaest kvadratića (Louis i Siegel, 2011). Na komoricu je potrebno postaviti pokrovnicu i uz sam vrh napuniti područje za brojanje. Stanice su zatim izbrojane u velikim kvadratima pomoću svjetlosnog mikroskopa, a koncentracija stanice izračunata je prema formuli:

$$\text{broj stanica po mL} = \text{srednja vrijednost broja stanica u četiri velika kvadrata} \cdot 5000$$



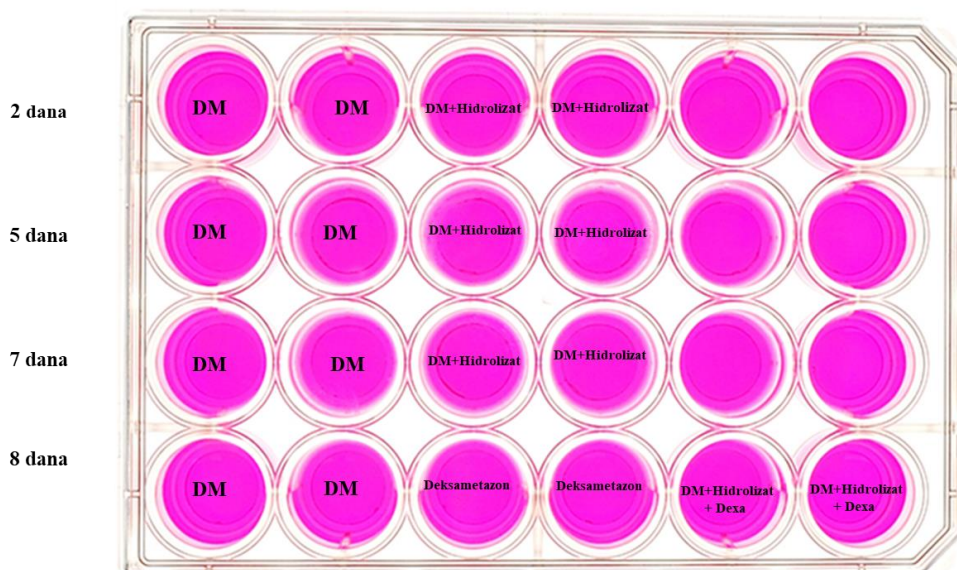
Slika 3. Prikaz izgleda Neubauerove komorice za brojanje stanica (vlastita izrada)

3.2.3. Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na vijabilnost C2C12 stanica MTS metodom

MTS je metoda koja omogućuje određivanje broja živih stanica u suspenziji, a zasniva se na redukciji spoja tetrazolina pomoću živih stanica u intenzivno obojeni formazan (Riss i sur., 2013). Promjena obojenja, odnosno koncentracije formazana detektirat će se spektrofotometrijski kao promjena apsorbancije pri valnoj duljini od 490 nm. Očitana apsorbancija u korelaciji je s brojem živih stanica pa će broj stanica biti veći što je veća apsorbancija. Stanice C2C12 uzgajane su u DMEM mediju uz dodatak fetalnog goveđeg seruma u inkubatoru s kontroliranom atmosferom CO₂ pri uvjetima 36,5 °C i 5 % CO₂. Za određivanje učinka djelovanja hidrolizata proteina lana na vijabilnost C2C12 stanica, stanice su tripsinizirane, izbrojane metodom tripan-plavo te su nacičepljene na ploču s 96 jažica. Za nacičepeljivanje je pripremljena suspenzija stanica i medija volumena 8 mL, početne koncentracije stanica od $2 \cdot 10^5$ st/mL. U svaku jažicu dodano je 100 μ L suspenzije stanica odnosno $2 \cdot 10^4$ st/mL te su stanice isti dan nakon što su se prihvatile, tretirane hidrolizatom proteina lana u rasponu koncentracija 0,5-5 mg/mL. Nakon 48 h uzgoja, u jažice je dodano po 10 μ L MTS reagensa te su stanice inkubirane tijekom 2 sata. Završetkom inkubacije izmjerena je apsorbancija u uzorcima pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

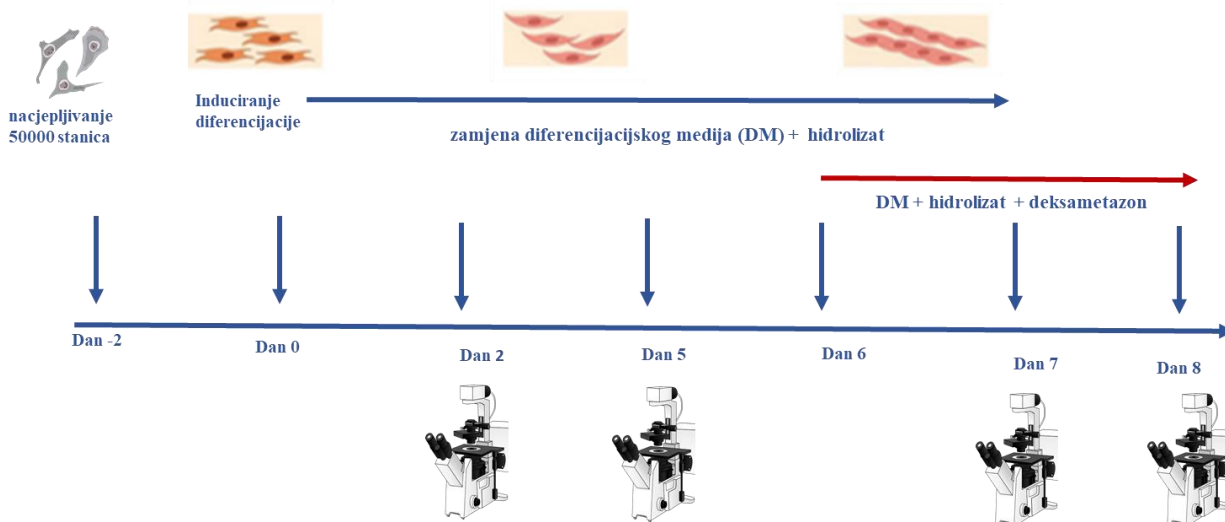
3.2.4. Učinak hidrolizata proteina lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica

Za određivanje učinaka hidrolizata proteina lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica, stanice su nacijepljene u ploče s 24 jažice u početnoj koncentraciji od $5 \cdot 10^4$ st/mL u mediju za uzgoj te su inkubirane tijekom 48 h. Nakon 48 h pod inverznim mikroskopom je provjereno da su stanice postigle konfluentnost od oko 80% nakon čega je uklonjen medij za uzgoj. Kontrolnim stanicama je dodano 500 μ L diferencijacijskog medija (DM), dok su ostale stanice tretirane hidrolizatom proteina lana u koncentraciji 1 mg/mL odnosno 6. dan nakon diferencijacije hidrolizatom proteina lana i 100 μ M deksametazona (Slika 4).



Slika 4. Prikaz ploče s 24 jažice tijekom provođenja eksperimenta utjecaja hidrolizata proteina lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica (vlastita izrada)

Ploča sa stanicama vraćena je u inkubator te je svakih 48 sati mijenjan medij sa i bez dodatka hidrolizata te su mikroskopski praćene promjene u veličini promjera stanica prema protokolu prikazanom na Slici 5.



Slika 5. Prikaz tijeka eksperimenta praćenja utjecaja hidrolizata proteina lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica (vlastita izrada)

3.2.5. Bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto

U ovom istraživanju korišteno je bojanje stanica bojom kristal - ljubičasto za praćenje diferencijacije C2C12 stanica. Boja kristal – ljubičasto ima primjenu u histologiji gdje se koristi za određivanje broja adherentnih stanica. Postupak se zasniva na činjenici da se boja veže na proteine i DNA u adherentnim stanicama čijim će se gubitkom u kulturi stanica zbog stanične smrti posljedično smanjiti izazvano obojenje (Feoktistova i sur., 2016). Postupak bojanja proveden je uklanjanjem medija za uzgoj iz prethodno kultiviranih C2C12 stanica na ploči s jažicama koje su zatim isprane sa 100 μ L PBS pufera. Nakon ispiranja u svaku jažicu dodano je po 100 μ L boje kristal-ljubičasto i stanice su stavljene u inkubator na 10 minuta. Nakon inkubacije stanice su višekratno isprane s PBS puferom kako bi se uklonili ostaci boje, nakon čega su stanice mikroskpirane.

3.2.6. Obrada podataka

Svi eksperimentalni podaci u ovom istraživanju obrađeni su pomoću programa Microsoft Excel. Za sve podatke izračunata je srednja vrijednost, standardna devijacija, a značajna razlika između rezultata određena je jednofaktorskom analizom varijance odnosno ANOVA testom.

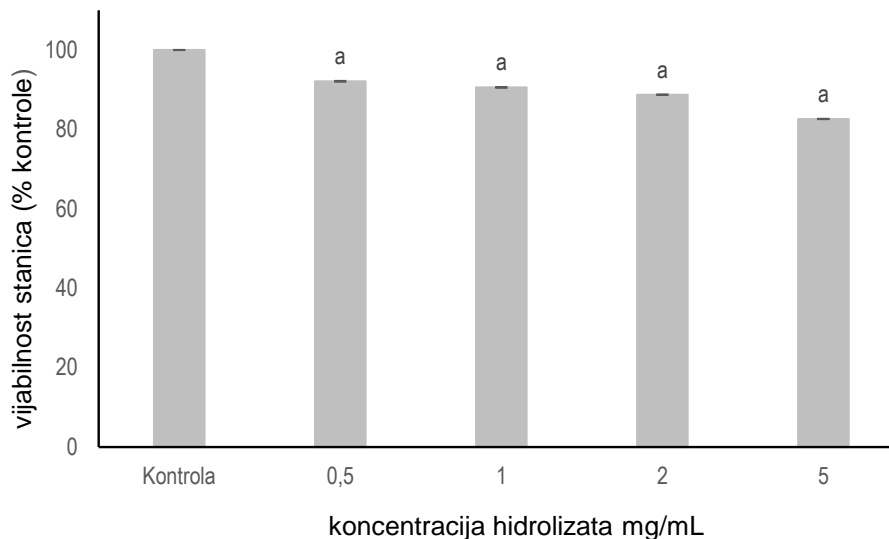
4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih godina fokus znanstvenih istraživanja usmjeren je na pripravu proteinskih hidrolizata iz prirodnih izvora kao funkcionalnih dodataka prehrani. U tom smislu uljne pogače koje zaostaju nakon izdvajanja ulja predstavljaju vrijednu sirovinu bogatu proteinima i bioaktivnim spojevima koji pokazuju blagotvoran učinak na zdravlje ljudi. Tako i uljna pogača lana sadrži značajne koncentracije proteina, vlakana i biološki aktivnih spojeva pa se sve više ispituje njen potencijal u sprječavanju i/ili odgađanja specifičnih bolesti među koje spada i starenje mišića tj. atrofija. Poznato je da proteinski hidrolizati pripremljeni iz različitih prirodnih izvora poput krumpira (Chen i sur., 2021) i ginsenga (Jiang i sur., 2019) poboljšavaju snagu mišića i sprječavaju njihovu atrofiju.

S obzirom na prethodno navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje pripremljenog proteinskog hidrolizata lana na vijabilnost i diferencijaciju C2C12 stanica te utvrditi posjeduje li i protektivno djelovanje na atrofiju C2C12 stanica induciranu dodatkom deksametazona.

4.1. Učinak hidrolizata lana na vijabilnost C2C12 stanica

Kako bi se utvrdilo djelovanje hidrolizata proteina lana na vijabilnost C2C12 stanica, stanice su naciepljene na ploču s 96 jažica u početnoj koncentraciji od 2×10^4 st/mL i tretirane su hidrolizatom lana u rasponu koncentracija 0,5-5 mg/mL. Nakon 48 h vijabilnost stanica određena je MTS metodom. Dobivene vrijednosti apsorbancije uzoraka s dodanim hidrolizatom proteina lana prikazane su kao postotak od vrijednosti apsorbancije izmjerene u kontroli odnosno u netretiranim stanicama (Slika 6).

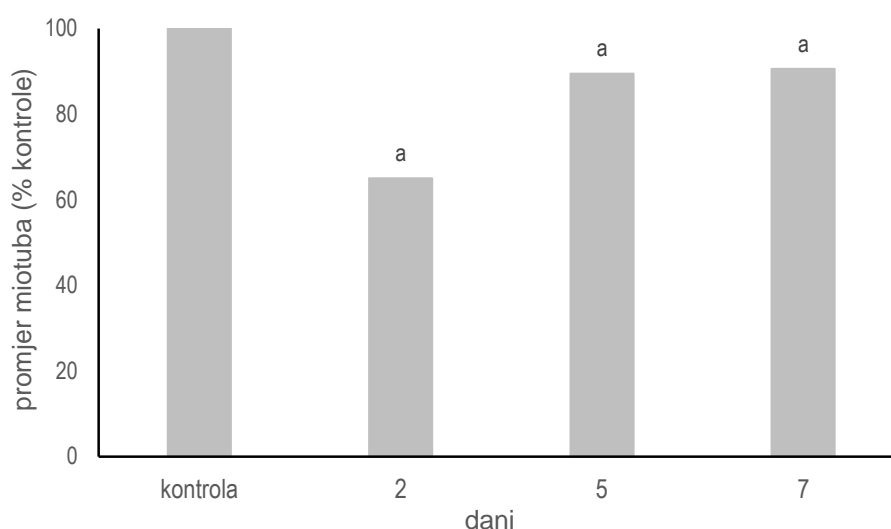


Slika 6. Učinak hidrolizata proteina lana u koncentracijama 0,5-5 mg/mL na vijabilnost C2C12 stanica. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Iz grafičkog prikaza rezultata na Slici 6. vidljivo je kako se vijabilnost C2C12 stanica tretiranih različitim koncentracijama hidrolizata proteina lana značajno smanjuje u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Kod najmanje koncentracije hidrolizata od 0,5 mg/mL uočeno je smanjenje vijabilnosti od 7,89 % dok je najveće smanjenje vijabilnosti uočeno kod najveće ispitane koncentracije hidrolizata od 5 mg/mL i ono iznosi 17,37 %. Dobiveni rezultati ukazuju na inhibirajuće djelovanje hidrolizata proteina lana na C2C12 stanice pri svim ispitanim koncentracijama. Dobiveni rezultati su u suprotnosti s rezultatima koje su objavili Hwangbo i sur. (2023) koji su ispitali citotoksičnost proteinskog hidrolizata konoplje u rasponu koncentracija 0,05-1 mg/mL pri čemu su sve ispitane koncentracije povećale vijabilnost C2C12 stanica. Brojna istraživanja koja su provedena u svrhu ispitivanja učinaka proteinskih hidrolizata iz različitih biljnih izvora upućuju da parametri poput porijekla ishodne sirovine, odabira enzima i vremena hidrolize proteina imaju ključnu ulogu u dobivanju biološki aktivnih proteinskih hidrolizata. Općenito, kada se ispituje djelovanje hidrolizata na stanične linije od iznimne je važnosti odrediti optimalnu koncentraciju koja će doprinijeti rastu i vijabilnosti stanica budući da visoke koncentracije hidrolizata mogu imati inhibitoran utjecaj na rast stanica zbog narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju uslijed vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida (Chun i sur., 2007).

4.2. Učinak hidrolizata lana na diferencijaciju C2C12 stanica

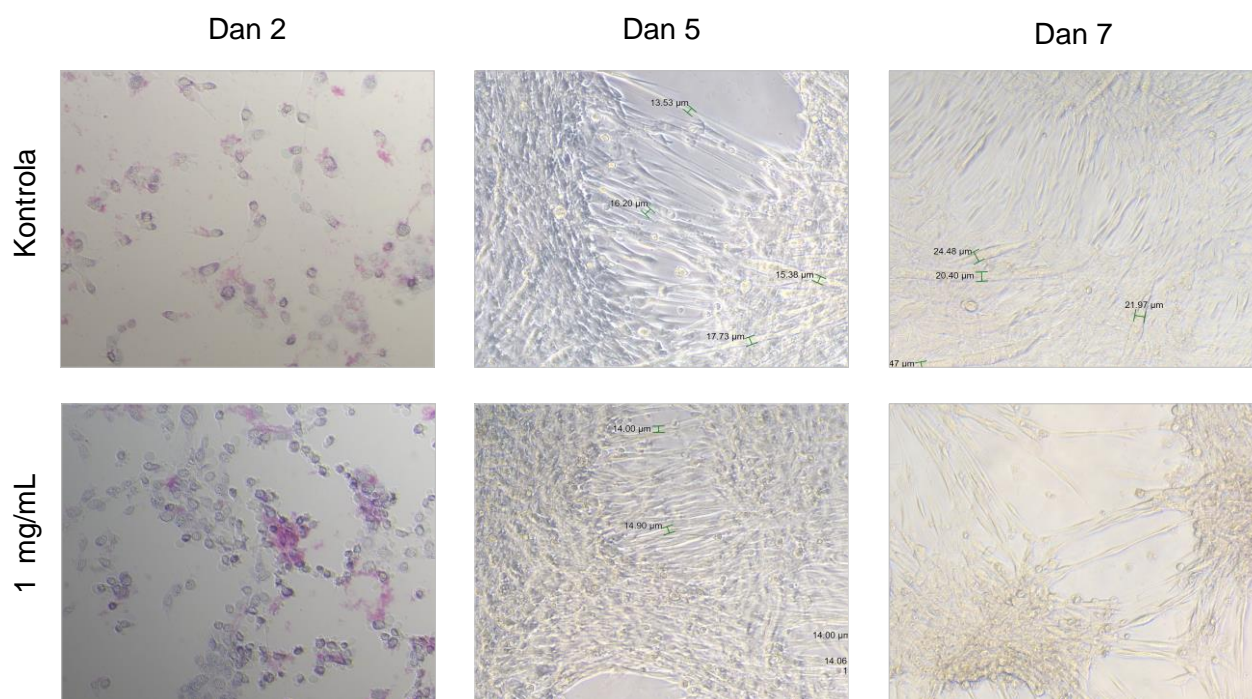
Za određivanje učinka dodatka hidrolizata proteina lana na diferencijaciju C2C12 stanica, a temeljem rezultata vijabilnosti C2C12 stanica, za tretman je odabrana koncentracija hidrolizata od 1 mg/mL. Stanice su tretirane kako je opisano u poglavlju 3.2.4. i analizirane prema protokolu prikazanom na Slici 5. Promjer stanica je određen drugog, petog i sedmog dana od početka diferencijacije korištenjem programa Digicyte. Dobiveni rezultati obrađeni su i prikazani kao postotak promjera tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice (Slika 7).



Slika 7. Utjecaj hidrolizata proteina lana koncentracije 1 mg/mL na diferencijaciju C2C12 stanica. ^a statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Na temelju dobivenih rezultata određivanja promjera diferenciranih miotuba, vidljivo je kako tijekom diferencijacije dolazi do smanjenja promjera tretiranih stanica. Rezultati dobiveni drugog dana pokazuju kako je promjer tretiranih stanica za 35,65 % manji od promjera kontrolnih stanica. Nakon pet dana od diferencijacije, promjer tretiranih stanica bio je za 10,41 % manji od kontrolnih stanica. Promjer tretiranih stanica nakon sedam dana od početka diferencijacije je za 9,38 % manji nego kod kontrolnih stanica. Najveća razlika u promjeru miotuba tretiranih i kontrolnih stanica je dva dana od početka diferencijacije stanica, dok se razlika petog i sedmog dana diferencijacije relativno ustabilila na oko 10 %. Dobiveni rezultati utjecaja hidrolizata proteina lana na diferencijaciju C2C12 stanica ponovno nisu u korelaciji s rezultatima djelovanja hidrolizata proteina konoplje (Hwangbo i sur., 2023) ili hidrolizata proteina krumpira (Chen i sur., 2021).

Osim određivanja promjera diferenciranih miotuba, C2C12 stanice su mikroskopirane u cilju praćenja njihove morfologije tijekom procesa diferencijacije (Slika 8).

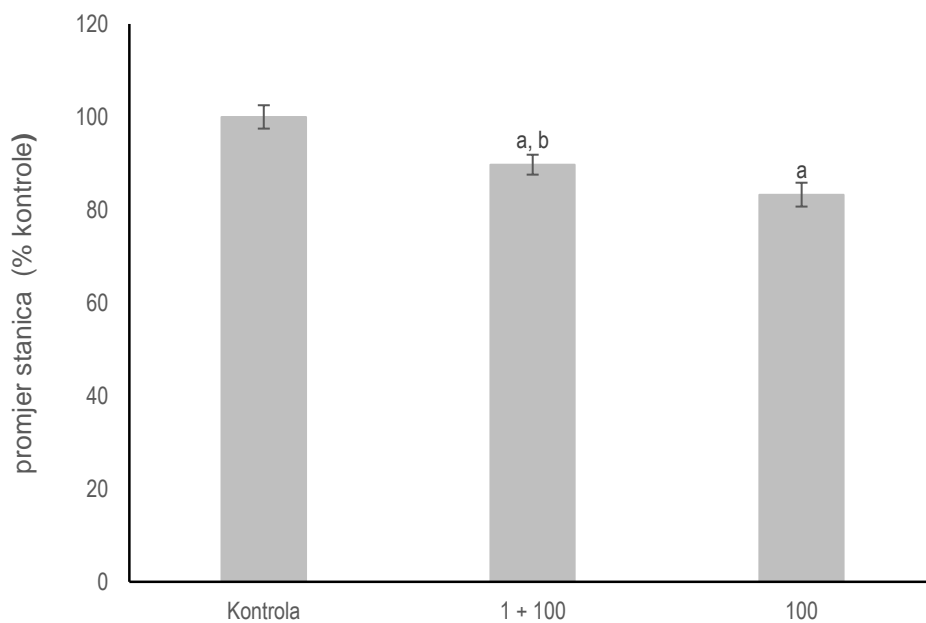


Slika 8. Morfologija kontrolnih C2C12 stanica i stanica tretiranih s 1 mg/mL hidrolizata proteina lana

Usporedbom morfologija tretiranih i kontrolnih stanica na Slici 8. vidljivo je kako su kontrolne i tretirane stanice drugog dana diferencijacije više okrugle nego izdužene budući da je proces diferencijacije još u početnoj fazi. Petog dana je vidljivo kako su se stanice izdužile i stanjile što je potkrijepljeno i rezultatima određivanja promjera miotuba, a morfologija kontrolnih i tretiranih stanica je relativno slična i ukazuje na nastajanje miotuba. Sedmi dan od početka diferencijacije kontrolne C2C12 stanice izgledaju uniformnije i posjeduju veći promjer miotuba dok se kod tretiranih stanica morfologija vidljivo promijenila. Tretirane stanice su vidljive u obliku okruglih nakupina i pokrivaju manju površinu za rast u usporedbi s kontrolnim stanicama. Slično kao i kod utjecaja na vijabilnost C2C12 stanica, hidrolizat proteina lana nije pokazao stimulacijski učinak na diferencijaciju C2C12 stanica.

4.3. Učinak hidrolizata lana i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica

U ovom eksperimentu promatrano je može li dodatak hidrolizata proteina lana umanjiti djelovanje deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica budući da je poznato da deksametazon izaziva atrofiju mišićnih stanica odnosno smanjuje njihov promjer. Stanice su 6. dana diferencijacije tretirane kombinacijom hidrolizata proteina lana u koncentraciji od 1 mg/mL i 100 μ M deksametazona te u drugom slučaju samo sa 100 μ M deksametazona. Nakon 48 h od izlaganja, izmjeren je promjer diferenciranih miotuba stanica pomoću programa Digicyte, a podaci su potom obrađeni i prikazani na Slici 9.



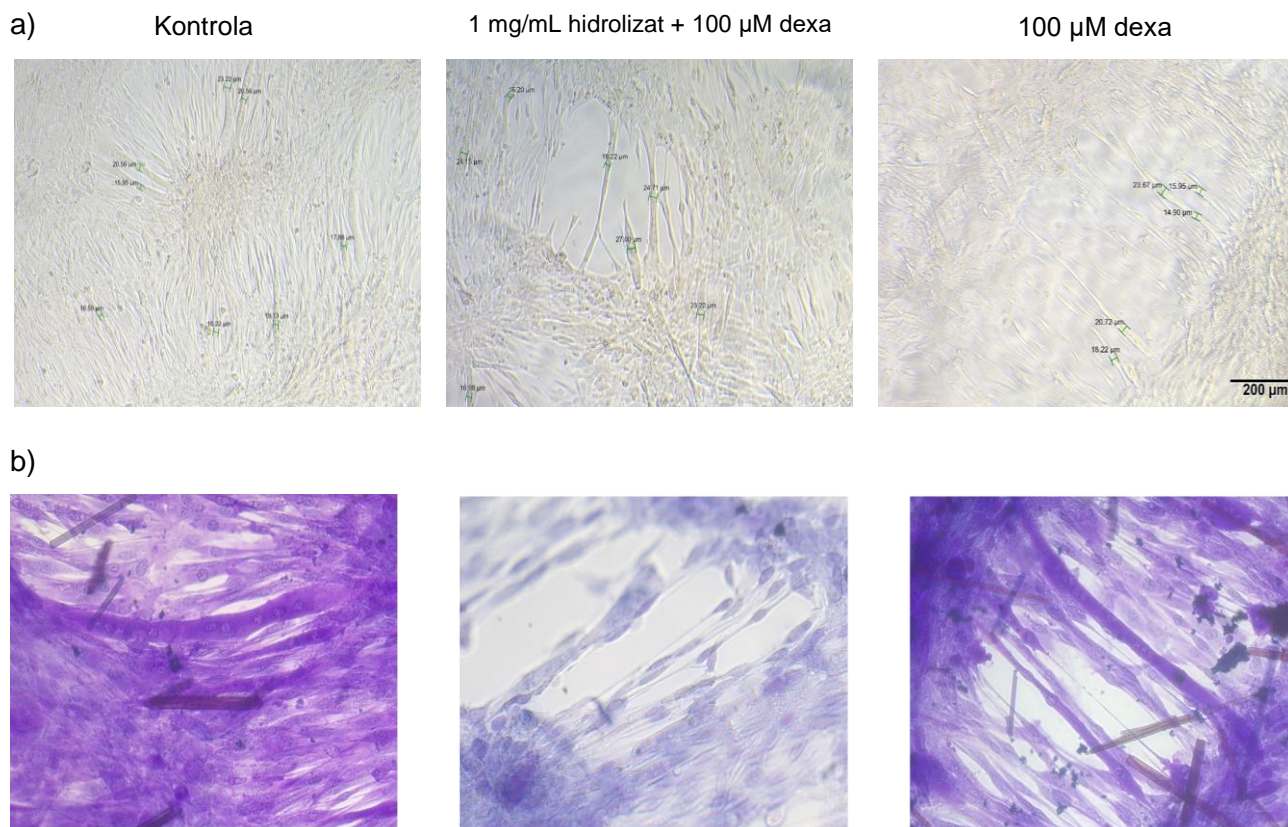
Slika 9. Utjecaj hidrolizata proteina lana koncentracije 1 mg/mL i 100 μ M deksametazona te utjecaj 100 μ M deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). ^bstatistički značajna razlika u odnosu na 100 μ M deksametazona ($p < 0,05$).

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 9. vidljivo je kako se promjer stanica tretiranih smjesom hidrolizata lana i deksametazona i stanica tretiranih samo s deksametazonom smanjio u odnosu na kontrolne stanice. Kod stanica tretiranih kombinacijom hidrolizata i deksametazona uočeno je smanjenje od 10,27 %, a kod stanica tretiranih deksametazonom smanjenje je iznosilo 16,71 % u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Dobiveni rezultati ukazuju da dodatak hidrolizata proteina lana u određenoj mjeri (oko 6,5 %) smanjuje atrofijski učinak deksametazona u odnosu na djelovanje samog deksametazona.

Osim određivanja promjera diferenciranih miotuba, C2C12 stanice su mikroskopirane u cilju

praćenja njihove morfologije tijekom praćenja učinaka hidrolizata proteina lana i deksametazona (Slika 10).

Dan 8



Slika 10. Morfologija stanica C2C12 tretiranih s 1 mg/ml hidrolizata proteina lana i 100 μM deksametazona, 100 μM deksametazona i netretiranih stanica. a) native stanice b) stanice obojane bojom kristal-ljubičasto.

Usporedbom morfologija stanica obojanih bojom kristal-ljubičasto (10b), u svim uzorcima uočava se da su stanice diferencirale u višejezgrene miotube, a stanice tretirane samo sa 100 μM deksametazona izgledaju izduženije i uže od netretiranih, kontrolnih stanica, a što je potkrijepljeno rezultatima određivanja promjera miotuba (Slika 9). Isto tako, dobiveni rezultati su dijelom u skladu s rezultatima koje su objavili Han i sur. (2017) koji su pokazali da tretman C2C12 stanica s 50 i 100 μM deksametazona uzrokuje nastajanja tanjih stanica tj. izazivaju atrofijski učinak u C2C12 stanicama.

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak hidrolizata proteina lana u koncentracijama 0,5 - 5 mg/mL pokazao je inhibicijski učinak na vijabilnost C2C12 stanica u rasponu od 7,89 - 17,37 % i proporcionalan je s koncentracijom ispitanog hidrolizata proteina lana.
2. Dodatak 1 mg/mL hidrolizata proteina lana smanjuje promjer diferenciranih miotuba za 10 % u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Morfologija tretiranih stanica izmijenjena je na način da stanice rastu u obliku okruglih nakupina i pokrivaju manju površinu za rast u usporedbi s kontrolnim stanicama.
3. Dodatak 1 mg/mL hidrolizata proteina lana pokazuje blagi protektivni učinak (+6,5 %) na atrofiju C2C12 stanica tretiranih sa 100 μ M deksametazona.

6. POPIS LITERATURE

Braithwaite JP, Al Khalili Y (2023) Physiology, Muscle Myocytes <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544225/>. Pristupljeno 14. 6. 2024.

Bajek S, Nikolić M, Šoić Vranić T, Bajek M, Marić I (2015) Mišićne progenitorne stanice u skeletnom mišiću. *medicina fluminensis*, **51**, 503 – 510. <http://hrcak.srce.hr/medicina>

Chal J, Pourquié O (2017) Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **144**, 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>

Chen YJ, Chang CF, Angayarkanni J, Lin WT (2021) Alcalase Potato Protein Hydrolysate-PPH902 Enhances Myogenic Differentiation and Enhances Skeletal Muscle Protein Synthesis under High Glucose Condition in C2C12 Cells. *Molecules* **30**, 6577. <https://doi:10.3390/molecules26216577>

Chun, BH, Kim JH, Lee HJ, Chung NH (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource Technology* **98**, 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.012>

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M (2016) Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi:10.1101/pdb.prot087379>

Freshney RI (2011) Culture of animal cell: A manual of basic techniques and specialized application 6. izd John Wiley & Sons, Inc., New Jersey

Gaurina Srček V, Ursić T, Logarušić M, Radošević K, Slivac I (2022) Biljni proteinski hidrolizati kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **17**(1-2), 3-10. DOI: 10.31895/hcptbn.17.1-2.7

Han DS, Yang WS, Kao TW (2017) Dexamethasone treatment at the myoblast stage enhanced C2C12 myocyte differentiation. *International Journal of Medical Sciences* **14**(5), 434-443. <https://doi.org/10.7150/ijms.18427>

Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE, Rudnicki MA (2017) The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin Cell Dev Biol* **72**, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010>

Holterman CE, Rudnicki MA (2005) Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* **16**(4-5), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.004>

Hwangbo Y, Kim JH, Kim T, Kim JH (2023) Effects of Hemp Seed Protein Hydrolysates on the Differentiation of C2C12 Cells and Muscle Atrophy. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **52**, 1225-1232 <https://doi.org/10.3746/jkfn.2023.52.12.1225>

Isesele PO, Mazurak VC (2021) Regulation of Skeletal Muscle Satellite Cell Differentiation by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Critical Review. *Frontiers in Physiology*. **12**, 682091. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682091>

Jedrzejczak-Silicka M (2017) History of Cell Culture. U: Gowder S (ured.) *New Insights into Cell Culture Technology*, InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/66905>

Jiang R, Wang M, Shi L, Zhou J, Ma R, Feng K, Chen X, Xu X, Li X, Li T, Sun L (2019) *Panax ginseng* Total Protein Facilitates Recovery from Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy through the Activation of Glucose Consumption in C2C12 Myotubes, *BioMed Research International* 3719643. <https://doi.org/10.1155/2019/3719643>

Kiewiet MBG, Faas MM, De Vos P (2018) Immunomodulatory Protein Hydrolysates and Their Application. *Nutrients* **10**(7), 904. <https://doi.org/10.3390/nu10070904>

Louis KS, Siegel AC (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods U: Stoddart MJ (ured.) *Mammalian cell viability: methods and protocols*, 1. izd. Humana Totowa, NJ, str. 7-12., <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21468962/>

Marijan Logarušić (2023) Učinci obogaćivanja hranjivoga medija proteinskim hidrolizatima sjemenki lana i konoplje na rast i produktivnost biotehnoški značajnih životinjskih staničnih linija. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

McCuller C, Jessu R, Callahan AL (2023) Physiology, Skeletal Muscle. StatPearls [Internet]. Treasure Island. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537139/>

Motohashi N, Asakura A (2014) Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2**, 1. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00001>

Nasri M (2017) Protein Hydrolysates and Biopeptides. *Advances in Food and Nutrition Research* **81**, 109–159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>

O'Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, Mota LM, Obaidi I, Quigley A, Xie Y, Butler M (2020) Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances* **43**, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>

Olsen, JV, Ong, SE, Mann M (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **3(6)**, 608–614. <https://doi:10.1074/mcp.t400003-mcp200>

Pasupuleti V.K., Braun S. (2010) State of Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. U: Pasupuleti V.K., Demain, A.L. (ured.): Protein Hydrolysates in Biotechnology, str. 10-32. Springer, Dordrecht, USA

Pawlikowski B, Vogler TO, Gadek K, Olwin BB (2017) Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Developmental Dynamics* **246**, 359-367. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24495>

Radošević K (2020) Kultura životinjskih stanica. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **69(9-10)**, 561 – 562, <https://hrcak.srce.hr/244366>

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ i sur. (2013) Cell viability assays U: Markossian S, Grossman A, Arkin M i sur. (ured.) Assay guidance manual [Internet], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>, Pristupljeno 26.5.2024

Roy M, Sarker A, Azad MAK i sur. (2020) Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) protein hydrolysates. *Food Measure*, **14**, 303–313 <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00292-4>

Song W, Kong X, Hua Y, Li X, Zhang C, Chen Y (2019) Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion stability of cottonseed protein hydrolysates. *LWT* 108724. doi:10.1016/j.lwt.2019.108724

Verma A, Verma M, Singh A (2020) Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* **2**, 269–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>

Walsh G, Walsh E (2022) Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology* **40**, 1722–1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>

Izjava o izvornosti

Ja Anamarija Šest izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis